

20. 病原体ゲノム解析研究センター

センター長 黒田 誠

概要

病原体ゲノム解析研究センターは、ウイルス感染症の発症に係わる宿主遺伝子の探索・解析を行う第一室、病原性ウイルスのゲノム解析を行う第二室、病原性細菌のゲノム解析を行う第三室から構成されている。

第一室では、主に子宮頸癌の原因となるヒトパピローマウイルス (HPV) の増殖とそれを支える細胞因子の研究および HPV による発癌メカニズムの解析、ならびに HPV 感染実態の疫学調査を行った。HPV は表皮や粘膜の微小な傷から侵入し、上皮基底細胞の核内にエピゾームとして潜伏・持続感染する。感染細胞が分化し表皮形成に至る過程でウイルスの増殖が起こるが、この生活環を支える分子機構は不明である。抗 HPV 薬の開発基盤とするため、HPV 生活環と感染・発癌における宿主応答・防御機構の詳細な解析を継続した。HPV 疫学調査については、WHO にて標準化された HPV ジェノタイピング法と HPV 抗体価測定法を用いて、我が国の HPV 感染実態の調査を行った。さらに製剤担当室として、HPV ワクチンの承認前検査、国家検定を担当した。

第二室では、主に新興・再興感染症の発生に深く関与する RNA ウイルスを研究対象とする。計算・情報・理論の先端科学に着目し、これらを感染症の流行防止に活用する新しい研究基盤を開発している。一般に未報告の変異のリスクは不明である。また分離ウイルスの迅速入手はしばしば困難で、さらには実験によるウイルスのリスク決定には時間がかかる。迅速な初動対応を補強する新たな基盤技術の創出は喫緊の課題である。二室では、病原体のゲノム情報から蛋白質の物性とその変化に関する情報を抽出し、病原体の生活環と生存戦略の理解向上に役立てている。これにはウイルスの感染・増殖、免疫逃避、薬剤耐性、病原性発現、流行、進化の構造基盤解明が含まれる。これにより、計算・情報科学は、ウイルスの生存戦略と性質変化の理解に極めて重要な貢献を果たすことを立証してきた。そこで現在、次の応用段階への挑戦を始めている。すなわち、ウイルスの制御法開発と将来予測である。前者には、ウイルスの感染・増殖・変異の理解向上に基づく論理的創薬が含まれる。後者には、

将来発生しうるリスク変異の包括的予測が含まれる。研究成果は、ウイルス感染症対策の補強に大きく貢献することが期待される。平成27年度は、ウイルスのリスク管理と制御法開発の基盤となる以下の情報を収集した。

(1) HIV の抗体逃避機構、(2) HIV の薬剤耐性機構、(3) HIV Vpr 蛋白質の機能発現機構、(4) ノロウイルスポリメラーゼの物性、(5) サフォードウイルスの神経細胞指向性、(6) サフォードウイルスの感染受容体候補探索、(7) 神経向性ピコルナウイルスのカプシド蛋白質多様性。

第三室は次世代シーケンサーを用いて病原体ゲノム情報の取得と情報解析に係る基盤整備を遂行している。病原体分離株の全ゲノム解析で病原性・薬剤耐性因子を同定するとともに、全ゲノム情報を基盤にしたゲノム分子疫学の基盤データベースの構築に取り組んでいる。また、各種病原体検査法で陰性であった感染症疑いの不明症例についてメタゲノム解析にて病原体検出を行っている。臨床検体に内在する全容を核酸配列として網羅的に検出するため、混合感染など総合的な病原体検査法として有効である。本年度は、大規模細菌ゲノム解析を行うための基盤作成、ゲノムデータベース作成を中心に行い、腸管出血性大腸菌、結核菌、薬剤耐性菌のゲノム比較解析、ゲノム分子疫学解析を遂行した。ゲノム分子疫学解析を検査現場でも有効に執り行うことができるよう、結核菌のゲノム分子疫学解析ツール TGS-TB、炭疽菌用の分子疫学解析ツール GcoGSA-BA を構築した。感染症が疑われる難病も不明症例の一つでもあり、その観点から潰瘍性大腸炎や川崎病の臨床検体から病態に関連する微生物因子の特定を行った。

業績

調査・研究

I. HPV に関する研究

1. HPV の感染増殖機構の研究

(1) HPV 感染初期過程におけるキャプシドタンパク質 L2 の役割

HPV 感染初期過程において、キャプシドタンパク質 L2

は膜融合制御タンパク質の一つ TRAPPC8 と相互作用する。これによりウイルスを包む輸送小胞膜とゴルジ体膜との融合を阻害すると考えられるがその意義は不明である。TRAPPC8 非結合型 L2 を含む偽ウイルス粒子を作成し、細胞内粒子数変化を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。粒子数の減少速度は野生型のそれに比べ上昇し、これはリソソーム阻害剤である NH₄Cl の添加で回復した。L2 による小胞膜-ゴルジ膜融合阻害の役割の一つとして、リソソームによるウイルス粒子分解回避が考えられた。(石井克幸)

(2) HPV 複製蛋白質 E1 のレベルを変化させる細胞 E3 ユビキチンリガーゼの探索

HPV16 ゲノムの複製に必須のウイルス蛋白質 E1 は、細胞内でユビキチン化を受けて分解され、低レベルに維持される。約 400 種類の細胞 E3 ユビキチンリガーゼを発見するプラスミドライブラリーを用いて、C33A 細胞での HPV 複製アッセイ系にてスクリーニングを行い、E1 レベルを減少させる複数の E3 ユビキチンリガーゼを見出した。また E1 レベルを著しく上昇させる E3 ユビキチンリガーゼとして、RNF146 が同定された。さらに細胞内 E1 レベルへの各種阻害剤の効果を調べる中で、ポリ ADP リボースポリメラーゼであるタンキレースの阻害剤 XAV939 の処理により、293 細胞での E1 レベルが上昇することが分かった。タンキレースまたは他のポリ ADP リボースポリメラーゼが HPV 複製を負に制御することが示唆された。(終元 巖、松尾理加[名古屋大学]、梁 明秀[横浜市立大学医学部])

2. HPV 感染状況についての調査・研究

(1) 子宮頸癌および前癌病変での HPV 遺伝子型分布の調査

子宮頸癌及び前癌病変 (CIN2/3) の擦過細胞検体を慶應大学病院にて定期的に収集して、HPV DNA 検出と型同定を継続的に行った。これまでの結果を集計したところ、CIN2 (300 検体) では HPV52 (32.3%)、HPV16 (31.0%)、HPV58 (20.0%)、CIN3 (283 検体) では HPV16 (45.9%)、HPV52 (24.7%)、HPV58 (14.1%)、子宮頸癌 (232 検体) では HPV16 (55.2%)、HPV18 (20.7%)、HPV52 (9.1%) が検出された。本データは将来のワクチン効果判定のためのベースラインデータとして有用である。(中村浩美、終元 巖、岩田 卓[慶應大学病院])

(2) ホルマリン固定パラフィン切片を用いた HPV 遺伝子型分布の調査

子宮頸部擦過細胞検体では複数の HPV 型がしばしば検

出されることから、実際に病変を引き起こしている原因型 HPV の同定が難しい。そこで、CIN 病変部から採取したバイオプシー検体のホルマリン固定パラフィン切片を用いて、HPV 遺伝子型の分布を調べた。合計 156 検体のパラフィン切片から QIAamp DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN) にて DNA を抽出して、Modified GP5+/6+ PCR で HPV DNA を増幅し、Bio-Plex ビーズソーターにて HPV 型同定を行った。その結果、CIN1 (53 検体) では HPV16 (11.3%)、HPV52 (11.3%)、HPV56 (11.3%)、CIN2 (39 検体) では HPV16 (30.8%)、HPV52 (15.4%)、HPV31 (10.3%)、HPV51 (10.3%)、HPV58 (10.3%)、CIN3 (64 検体) では HPV16 (48.4%)、HPV52 (15.6%)、HPV31 (10.9%) が検出された。(中村浩美、終元 巖、藤井多久磨[藤田保健衛生大学])

(3) HPV 抗体の血清疫学調査

14 種類の HPV (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 68) のウイルス様粒子を用いたハイスループット抗体測定系により、日本人健常人 (男 97 人、女 103 人) での HPV 抗体保有率を調べた結果、男女ともに幅広い年齢層で HPV35, 31, 6 の抗体保有率が高いことが分かった。それぞれの抗体保有率は HPV35: 男 23.7%、女 13.6%、HPV31: 男 17.5%、女 18.4%、HPV6: 男 14.4%、女 17.5%であった。一方、子宮頸癌で高頻度に検出される HPV 型の抗体保有率は、HPV16: 男 3.1%、女 1.9%、HPV18: 男 4.1%、女 1.0%、HPV52: 男 5.2%、女 3.9%、HPV58: 男 4.1%、女 4.9%であった。(終元 巖、石井克幸、Joakim Dillner[Karolinska Institute])

3. HPV 感染による発癌機構の研究

(1) HPV による APOBEC3B 発現活性化に関する研究

子宮頸癌を含む種々の癌で、細胞の DNA/RNA 改変酵素 APOBEC3B (A3B) の高発現が認められ、APOBEC に特徴的な変異が癌ゲノムに蓄積していることから、発癌における変異原として A3B が注目されている。これまでに、HPV の癌蛋白質 E6 が A3B 遺伝子の発現を誘導することを見出し、A3B プロモーター内の E6 応答領域を特定した。今年度は、E6 による A3B プロモーター活性化機構の詳細を調べた。A3B プロモーターの E6 応答領域にある MCAT motif に宿主転写因子 TEAD が結合した。レポーター実験で、TEAD は MCAT motif 依存的に A3B プロモーターを活性化した。表皮角化細胞に E6 を発現させると、TEAD の発現が上昇し、A3B プロモーターへの TEAD 結合が増加した。E6 を発現する表皮角化細胞で TEAD をノックダウンすると、A3B の mRNA レベルが減少した。一方、表皮角化細胞に TEAD を過剰発現させると、A3B の mRNA レベルが上昇した。こ

これらの結果は、E6 が TEAD の発現上昇を介して、A3B 発現を誘導することを示しており、発癌における E6 の新たな機能と考えられる。(森 清一郎、終元 巖)

(2) 次世代シーケンサーを用いた HPV ゲノム解析

感染者体内での HPV16 ゲノム配列の多様性を、次世代シーケンサーで解析することを目的に、CIN および子宮頸癌患者から子宮頸部擦過細胞を採取した。筑波大学病院を受診する患者から、これまでに 55 検体を収集し、DNA 抽出、HPV ジェノタイピングの後、HPV16 陽性の検体に対して全長 HPV16 ゲノムを long PCR にて増幅した。得られた PCR 産物を Nextera XT kit (イルミナ) を用いてライブラリー化した。また HPV52 についても同様の作業を行った。今後、次世代シーケンサーによる配列解析を行う。(終元 巖、中村浩美、小貫麻美子[筑波大学病院])

4. 次世代 HPV ワクチンの開発

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて抗 HPV 交叉性中和抗体を生体内で安定して発現させることにより幅広い型の HPV 感染を防ぐことを目的とした受動免疫ワクチンの開発を行なった。ヒトでの使用を念頭に、マウス由来の抗 HPV 交叉性中和抗体の可変領域とヒト IgG 定常領域を融合したキメラ抗体を作成した。キメラ抗体は、調べた 8 つの発癌性 HPV を全て中和したことから、中和活性と交叉性を維持していることがわかった。続いて、このキメラ抗体を発現する AAV ベクターを作成し、マウス骨格筋に接種した。接種 3 ヶ月後、血清中に最大約 100 μ g/ml のキメラ抗体が分泌されていることを ELISA により確認した。今後、このマウスを用いて HPV 感染実験を行い、受動免疫ワクチンによる感染防御効果を評価する。(森 清一郎)

II. 遺伝子組換え弱毒ウイルスの増殖が可能な自然免疫系遺伝子ノックアウト iPS 細胞の作出

弱毒生ワクチンの増殖を可能にすることを目指して新規のワクチン製造用培養細胞を作出する。CRISPR/Cas9 システムを用いて自然免疫系遺伝子をノックアウトしたヒト iPS 細胞クローンを得た。二本鎖 RNA 認識経路上の MAVS (IPS-1) 遺伝子を標的とする gRNA と Cas9 蛋白質の複合体を iPS 細胞にエレクトロポレーションにより導入した。ミスマッチ切断酵素を用いたアッセイでは変異導入率は 40%強であった。細胞をクローニングし塩基配列を確認したところ、両アレルにフレームシフト変異が導入されているものが 20 クローン中 6 クローンあった。ヒ

トゲノム上でミスマッチ塩基数に基づいてオフターゲット候補を検索すると 1 ミスマッチ、2 ミスマッチのものではなく、3 ミスマッチのものが 4 箇所あった。20 クローンにおいてこれら 4 箇所の塩基配列に変異があるものはなかった。マーカーによる選択を行うことなく、効率よく遺伝子ノックアウト iPS 細胞を得ることができた。(竹内隆正)

III. 臨床応用されたウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報の収集

我が国での遺伝子治療臨床試験計画を審査する作業部に適切な意見を提供するため、Human Gene Therapy、Gene Therapy、Molecular Therapy、Journal of Gene Medicine、及び Nature Medicine 等の遺伝子治療専門誌の論文、日本遺伝子治療学会での講演等からウイルスベクターの安全性・有効性に関する情報を収集・検討する作業を継続して行った。(竹内隆正、森 清一郎、石井克幸、終元 巖)

IV. *in silico* 構造解析の応用

(1) 抗体中和抵抗性 gp120 構造を維持する Glycan shield の分子メカニズム

HIV-1 gp120 の中和抗体逃避メカニズムの 1 つとして Glycan shield が知られている。しかし、立体構造を見ると必ずしも糖鎖はエピトープを隠しておらず、Glycan shield のメカニズムは未だ明らかでない。本研究では、糖鎖有または糖鎖無の HIV-1 gp120 の動的性質を分子動力学計算により調べ、Glycan shield の分子メカニズムを検討した。初期構造からの構造変化の指標として RMSD を調べた。糖鎖無 gp120 の RMSD は、糖鎖有 gp120 のそれより大きく、糖鎖無 gp120 は糖鎖有 gp120 よりも大きく構造変化した。これは V1/V2 の配置が大きく変化していることに起因していた。次に、構造の揺らぎを調べた。糖鎖無 gp120 では V3 が大きく揺らぎ、gp120 コアから離れる構造も観察された。一方、糖鎖有 gp120 では V3 が gp120 コアの近傍で揺らぎ、gp120 コアから離れる構造は観察されなかった。これは糖鎖有ならば gp120 が三量体配置に置かれた時、抗 V3 抗体エピトープの V3 先端が、抗体のアクセスできない位置に保持されることを意味する。すなわち、糖鎖は V1/V2、V3 の構造動態制御因子であり、これらの配置と揺らぎを調節してエピトープ暴露を抑制し、抗体中和低感受性構造を維持する機能をもつことを示唆する。(横山勝、佐藤裕徳)

(2) CD4 類似低分子化合物誘導体 (CD4MCs) の耐性機

序解析

CD4 類似低分子化合物 (CD4MCs) は HIV-1 gp120 を標的とする。HIV-1 gp120 の CD4MCs 耐性獲得機序を明らかにするために、分子動力学(MD)計算を行った。野生株では NBD556、JRC-II-191 および YYA021 は、いずれも抗 HIV 活性を示す。これらは、MD 計算においても各誘導体の Phe43 キャビティへの結合が認められた。次に、V255M 変異体の MD 計算を行った。V255M 変異体では全ての誘導体が抗 HIV 活性を示さない。MD 計算においても、50 ns までに NBD-556 および YYA021 は既に結合を消失し、結合親和性の減少することが示された。M426I 変異体は、NBD556 および JRC-II-191 は野生株よりも約 10 倍低下の抗 HIV 活性を示すが、YYA021 のみ活性が認められない。この M426I 変異体の MD 計算を行うと、YYA021 のみ 50 ns までに既に結合しておらず、V255M 変異体同様に結合親和性の減少が示唆された。(横山勝、原田恵嘉[エイズセンター]、松下修三[熊本大]、俣野哲朗[エイズセンター]、玉村啓和[東京医科歯科大]、吉村和久[エイズセンター]、佐藤裕徳)

(3) X線結晶構造解析による HIV-1 Vpr の importin- α への結合機構の解析

Vpr は 96 アミノ酸からなる、HIV-1 のアクセサリ遺伝子産物の一つであり、ウイルスの生活環の様々なステップにおいて多様な機能を発揮する。Vpr のインポーチン α 結合機構を解明するため、X線結晶構造解析、物理化学的測定および GST プルダウン法等を行った。Vpr とインポーチン α の相互作用領域を決定するためにカロリーメトリーを行った。その結果、インポーチン α は Vpr C 末端と結合したが、Vpr N 末端には結合しなかった。GST プルダウン法でも、Vpr C 末端がインポーチン α の結合に必須であることが確認された。Vpr C 末端ペプチドとインポーチン α との複合体結晶の調製に成功し、X線結晶構造を解析すると、Vpr C 末端はねじれた β ターン構造を形成し、インポーチン α の 2 量体化を引き起こしつつ、minor-NLS 結合部位に結合することが分かった。一方、Vpr C 末端は、インポーチン α の major-NLS 結合部位にも、異なる立体構造で結合していた。このことは、Vpr が誘導適合機構により構造を変化させ、様々な構造で宿主タンパク質と結合することを示唆している。(宮武秀行[理研]、三城明[プロテインウエーブ]、村上知行[理研]、村上裕信[理研]、松田剛[理研]、萩原恭二[理研]、横山勝、佐藤裕徳、宮本洋一[健康・栄養研]、堂前直[理研]、間陽子[理研])

(4) 分子動力学計算によるノロウイルスポリメラーゼの動的性質の解析

ノロウイルスはウイルス性食中毒・急性胃腸炎の原因ウイルスである。ノロウイルスの抗ウイルス薬は未だ実用化されていないため、抗ウイルス薬の実用化が望まれている。本研究では、ノロウイルスポリメラーゼを標的とする阻害剤開発のための構造特性情報を得るために、ノロウイルスポリメラーゼの分子動力学計算を行い、機能発現に重要な動的性質を調べた。平衡構造のゆらぎを調べると、いずれも Thumb ドメインのゆらぎが大きく、Palm ドメインのゆらぎが小さかった。それぞれの構造の中で連動して運動する部位を知るために、動的相互相関行列を計算した。いずれにおいても、Thumb ドメインと Fingers ドメインに連動して反対方向に運動している結果が得られた。Thumb ドメインと Fingers ドメインの連動する運動は、これらのドメインの間にテンプレート/プライマーを挟むことから、ホスホジエステル結合形成後に、次の基質を取り込むために重要な動的性質と考えられる。(横山勝、朴英斌[ウイルス2部]、片山和彦[ウイルス2部]、佐藤裕徳)

(5) サフォードウイルスの神経系細胞での増殖性に関する研究

サフォードウイルスは、神経病原性が懸念されている。無菌性髄膜炎を発症したサフォードウイルス感染者の脳脊髄液から分離された臨床分離株をマウス小脳で継代し、ゲノムと細胞指向性の変化を調べた。継代株では、カプシド蛋白質のみに 3 箇所のアミノ酸置換が生じていた。この馴化株の神経系細胞での感染・増殖能をマウス神経前駆細胞、マウスアストログリア細胞、ヒト小脳神経前駆細胞由来 ONS-76 細胞、ヒトアストログリア由来 U-251MG 細胞を用いて調べた。その結果、カプシド蛋白質の 3 箇所のアミノ酸変異は、マウス、及びヒト由来神経系細胞での感染・増殖能に変化をもたらすことがわかった。(小谷治、横山勝、永田典代[感染病理部]、佐藤裕徳)

(6) *in silico* 構造解析を用いたサフォードウイルスの感染受容体候補探索

糖鎖がサフォードウイルスの感染受容体となりうるかを予備的に検討した。ヒト上皮細胞表面に発現する種々の糖鎖構造を構築し、カプシドタンパク質と糖鎖の結合シミュレーションを行った。その結果、VP2 領域には、糖鎖が結合するポケットが存在することが判明した。(小谷治、横山勝、佐藤裕徳)

(7) 神経向性ピコルナウイルスカプシド蛋白質の多様性

近年、ヒトピコルナウイルスの一部でヒト神経病原性が懸念されている。ピコルナウイルスのリスク管理と制御を念頭に、Enterovirus A71、Enterovirus D68、Saffold virus の多様性と構造生物学知見の収集を開始した。公共データベースからゲノムおよびアミノ酸情報を収集し、株名、遺伝子型、採取材料、患者の臨床症状、および引用文献を付加したウイルスゲノムデータベースを作成した。データベースを用いてカプシドタンパク質の情報エントロピー値を算出した結果、可変部位は、推定レセプター溝や抗体結合部位近傍に位置することがわかった。免疫逃避の過程で受容体指向性の変化が生じる可能性がある(小谷治、横山勝、佐藤裕徳)

V. バイオテロ・新興再興感染症・薬剤耐性菌対策としての超高速ゲノム解読・解析システムの構築

バイオテロ・新興再興感染症による非常事態に対応するため、“迅速・網羅的・正確”を兼ね備えた次世代シーケンサーによる超高速ゲノム解読システムを既に構築してきた。これまでに WHO 指定バイオテロ病原体である *Bacillus anthracis* 炭疽菌、*Yersinia pestis* ペスト菌、*Francisella tularensis* 野兎病菌、*Burkholderia pseudomallei* 類鼻疽菌のゲノム情報解析を行ってきた。また、近年問題となっている *Salmonella* (Sa) を含む薬剤耐性菌のゲノム情報解析にも取り組み、ネットワーク経由で分子疫学解析を行うための情報解析パイプライン Global core Genome SNP Analysis: GcoGSA Sa を構築してきた。本年度は、未だ先進国内において罹患率が高く、世界的にも多剤耐性が問題になっている結核菌のためのゲノム分子疫学解析パイプライン TGS-TB (Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* (TB)) を構築した。TGS-TB は、ネットワーク経由で操作でき、次世代シーケンサーのゲノム解読データを用いて、薬剤耐性予測、スポリゴタイピング、IS6100 挿入位置タイピング、MIRU-VNTR およびゲノム分子系統解析を一度に行い、株間の比較解析をする。ゲノム分子系統解析のみならず、従来使用されていたタイピング法(スポリゴタイピング、IS6100 挿入位置タイピング、MIRU-VNTR)も組み込むことで、より詳細な分子疫学解析を行うことが可能となった。集団事例を含む、MIRU-VNTR が同一パターンであった株を用いて解析を行ったところ、ゲノム分子系統解析および IS6100 挿入位置タイピング結果により、集団事例株と散发事例を明確に分類することができた。更に、バイオテ

ロ対策として、ネットワーク経由で炭疽菌のゲノム分子疫学解析を行うための情報解析パイプライン Global core Genome SNP Analysis *Bacillus anthracis*: GcoGSA-BA も構築した。

(関塚剛史、山下明史、黒田誠、村瀬良朗[公益財団法人結核予防会結核研究所]、岩本朋忠[神戸市環境保健研究所]、御手洗聡[公益財団法人結核予防会結核研究所]、加藤誠也[公益財団法人結核予防会結核研究所])

VI. 多剤耐性菌感染症の疫学と国内における対応策に関する研究

薬剤耐性(AMR)感染症が世界的に拡大しており、2015年には WHO から AMR グローバルアクションプランが提唱され、サーベイランス・研究を通じた実態把握の強化が急務となっている。これまでに、ゲノムセンターでは所内および所外の研究者との共同研究で、多数の薬剤耐性菌のゲノム解析を行ってきた。それらデータを管理・運用し、且つ、多検体の解析を簡便に行うためのシステム GenEpid-J (Genomics and Epidemiology in Japan) を構築した。GenEpid-J には、臨床・動物・環境由来の多種にわたる細菌のゲノムデータが蓄積されており、今年度までに約 600 株、約 1,700 プラスミド配列を決定し、データベースを作成した。2015年にコリスチン耐性に関する新規因子 MCR-1 が中国から報告されたため、上記データベースにて検索したところ、国内で分離された4株の大腸菌と1株のサルモネラ菌が MCR-1 を保有していたことを明らかにした。国内での新規薬剤耐性遺伝子保有細菌の存在を迅速に報告するには、データベースの作成・拡充が非常に重要であることが強く示唆された。(関塚剛史、山下明史、黒田誠、松井真理[細菌第二部]、鈴木和和[細菌第二部]、柴山恵吾[細菌第二部]、大西守[大西獣医微生物ラボラトリー]、秋庭正人[国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構]、川西路子[農林水産省動物医薬品検査所])

VII. 大規模ゲノム解析のための自動解析パイプラインの開発

細菌ゲノム解析を行う対象種が格段に増え、ゲノム解析を行う業務が多岐に渡ってきた。そのため、次世代シーケンサー(NGS)の解読リードを用いた *de novo assemble*、解析対象サンプルの生物種推定、血清型推定、コンタミネーションの確認、MLST によるタイピング、薬剤耐性遺伝子・病原遺伝子検索、プラスミド検索、遺伝子抽出および遺伝子のアノテーションを全て自動で行うためのパイプライン Automatic Microbial Genome

Annotation (AMiGA)を構築した。AMiGA は GenEpid-J に組み込まれている。全自動化にしたことで、効率良く大規模ゲノム解析が行えるようになった。また、コンタミネーションのチェックが可能になったことで、ゲノム分子系統解析や比較ゲノム解析などの二次解析をさらに効率良く行えるようになった。

(関塚剛史、山下明史、黒田誠)

VIII. 薬剤耐性プラスミドの由来をトレースする情報解析システムの開発

近年、複数の抗菌薬に耐性を持つ細菌の出現が深刻化しており、WHO でも大きく取り上げられている。細菌に薬剤耐性を付与する遺伝子はプラスミド(薬剤耐性プラスミド)を媒介として異なる種類の細菌にも伝達されるため、尿路感染症・肺炎・血流感染などの日和見感染症を起こす細菌だけでなく、環境中に存在する細菌が持つ薬剤耐性プラスミドの動向をも把握することが重要である。我々は平成 25 年度から、ブラウザ経由で次世代シーケンズデータを用いて網羅的なプラスミド解析を円滑に行うことのできるシステム (Global Plasmidome Analyzing Tool: GPAT) と、GPAT 解析結果から得られたプラスミド間の関係性をネットワークとして表示するシステム (inter Plasmid Analyzing Tool: iPAT) を構築し、毎年改良を加えてきた。平成 27 年度は GPAT 中で使用する不和合性タイプ (Inc type) 推定データベースの見直しを行い、より詳細な不和合性タイプの推定を可能にした。また、iPAT は従来、GPAT で解析したデータ同士を比較する目的で作成されていたが、GPAT 以外で作成したデータを解析する必要性が出てきたため、GPAT とは独立したアプリケーションとして open iPAT をスピニアウトさせた。

(山下明史、関塚剛史、黒田誠)

IX. 院内感染事例に係る薬剤耐性細菌の比較ゲノム解析

国内で発生した院内感染事例由来分離株の比較ゲノム解析を行った。これら解析の一部は、GenEpid-J 上で解析を行った。分離日の時系列に合わせてゲノム上に塩基置換が段階的に数カ所ずつ入る事例と、時系列に添わず、菌株間で多数の塩基置換が確認される事例が確認された。時系列と塩基置換数との相関は、原因となる耐性菌に近い過去で蔓延したのか、長期間に渡り蔓延していたかに関与する可能性が示唆された。

(関塚剛史、山下明史、黒田誠、松井真理[細菌第二部]、

鈴木里和[細菌第二部]、柴山恵吾[細菌第二部])

X. 集団食中毒事例に係る病原細菌の比較ゲノム解析

2011 年に富山県、福井県および神奈川県で腸管出血性大腸菌 (EHEC) 血清型 O111 を中心とする重症化の傾向が高い集団食中毒事例が発生した。本事例分離菌株の特徴を俯瞰的かつ包括的にゲノムレベルで解明するため、本事例の富山の溶血性尿毒症症候群(HUS)患者由来分離菌株(EHEC O111 110512 株)の完全長ゲノム配列決定を行った。Illumina 社および Pacific Biosciences 社の 2 種類の次世代シーケンサーを用いたことで、効率良く完全長ゲノム配列を決定することができた。上記完全長配列を用いた解析により、重症患者由来 EHEC に特徴的な遺伝子が Stx2 prophage 上に存在することが示唆された。

(関塚剛史、黒田 誠、伊豫田淳[細菌第一部]、大西 真[細菌第一部]、綿引正則[富山県衛生研究所]、磯部順子[富山県衛生研究所]、佐多徹太郎[富山県衛生研究所])

XI. 難治性腸疾患患者の腸内細菌フローラの網羅解析

難治性腸疾患、特に潰瘍性大腸炎 (UC) は、個有の遺伝的背景と腸内細菌叢が密接に関連して発症する事が示唆されている。三種の抗菌剤 (アモキシシリン/テトラサイクリン若しくはホスホマイシン/メトロニダゾール) を二週間投薬するだけで、その疾患が 1 年以上緩解する治療例が報告されている。しかしながら、その患者腸管内の膨大な細菌叢の中で、どの細菌が最もその疾患と関連するのかわからない。本研究では、UC 発症の環境要因となる細菌叢を抗菌剤治療前後でメタゲノム解析を行い、本疾患と密接に関連する細菌の探索を行なった。UC 患者 61 名の治療前、治療後の腸内フローラの比較解析を横断的に行なった。その結果、抗菌剤治療前では *Bacteroides* 属と *Clostridiales* が多い群および *Proteobacteria* と *Clostridiales* が多い群が存在し、治療後で *Bifidobacterium* と *Lactobacillus* が有意に上昇していた。一方、再燃寛解を繰り返す患者では、治療によって *Bacteroides* 属と *Clostridiales* が減少していなかった。また、潰瘍性大腸炎 (UC) 患者より臨床分離された *F. varium* Fv113 株の全ゲノム塩基配列決定後の比較ゲノム解析により、本菌株は、基準株である *F. varium* ATCC 株よりも多数の病原性に関与すると思われる遺伝子が存在していることが明らかとなった。(関塚剛史、黒田 誠)

XII. 次世代シーケンズデータからウイルス配列を構築するシステムの開発

近年、塩基配列決定技術は著しい発展をしており、患者由来の臨床サンプルから次世代シーケンサーを用いて

病原体を検出することは珍しくなくなっている。このため、次世代シーケンサーを用いた病原体の検出は今後ますます一般化してゆくものと思われる。次世代シーケンサーを用いて病原体ウイルスを検出した場合、そのウイルスの完全長配列を再構築し、系統関係や性質を調べることは疫学上重要である。しかしながら、次世代シーケンサーを用いて検出した病原体ウイルスの配列断片から全長配列を再構築するには高価なソフトウェアを使うか、コンピュータ上で複雑なコマンド操作をする必要があるなどの問題により一般化していない。そこで我々は、ブラウザ経由で次世代シーケンスデータからウイルス全長配列を再構築するシステム (Virus Genome-Targeted Assembly Pipeline: VirusTAP) を構築した。VirusTAP は入力された次世代シーケンスデータから品質の悪い部分やウイルス以外の配列を取り除いた後、配列アセンブルを行い、ウイルス全長配列を推定するソフトウェアである。VirusTAP はまた、再構築した配列を公共塩基配列データベース (NCBI NT) と相同性検索を行い、ウイルス種を推定することができる。さらに、再構築した配列に入力データをマッピングし、再構築した配列が正しいかどうか評価を行うことができる。

(山下明史、関塚剛史、黒田誠)

XIII. デングウイルス遺伝子型データベースおよびブラウザアプリの開発

地球温暖化に伴う蚊の生息域拡大に伴い、従来熱帯地域からの輸入感染症であったデング熱などの感染症が日本国内でも蔓延する可能性が懸念されている。実際、2014年にはデング熱の国内感染症例が70年ぶりに国内で報告された。デングウイルスは4つの血清型が知られており、それぞれの血清型は5-6種類の遺伝子型に分類することができる。デングウイルスの4つの血清型は地域分布に特徴を持たないが、遺伝子型は地域により特徴的な分布を示すため、感染源推定の重要な手掛かりになると考えられる。一方、デングウイルスの血清型は公共データベース (NCBI 等) を参照することで容易に判別することができるが、遺伝子型について最新の情報を提供しているサイトは Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR) のみが知られている。しかしながら ViPR では遺伝子型と地域的な分布との関係を知ることができないため、我々は最新の公共データベースから取得したデングウイルス配列を遺伝子型ごとに分類し、世界地図上にその分布を示す web アプリケーション Dengue Genographic Viewer (DGV) を開発した。DGV はデングウイルスの遺伝子型分布を地図上に示すだけでな

く、相同配列検索機能や日本への輸入症例の図示機能も備えており、上で紹介した VirusTAP と組み合わせて使用することにより、輸入症例ウイルスの起源推定や、国内感染症例かどうかを判断する助けになることが期待される。(山下明史、関塚剛史、黒田誠)

XIV. 原因不明脳炎症例における網羅配列解読・病原体データベースの作成

全国の医療機関から症状・所見とともに適切な時期に臨床検体を収集し、日本脳炎ウイルスの病原体診断を実施するとともに、原因究明を目的としてエンテロウイルスを含めた網羅的な病原体検索を行い、日本脳炎患者の予後ならびに急性脳炎・脳症、ADEM の実態・病因解明に資することを目的とする。分担研究者は、急性脳炎・脳症の原因究明を目的とした次世代シーケンサー (next-generation sequencing: NGS) による網羅的病原体検索を担当した。

本年度は23名の不明脳炎・脳症患者について、網羅的病原体検索が必要と判断された検体の検査を行った (P45-P89, 45症例のうち7症例はNGS検査前に当該病原体が確定、15症例はRNA分解等で不適当な臨床検体であったためNGS検査未実施)。それぞれの患者髄液から Human astrovirus MLB-1, HHV-3, 細菌等の病原体配列を検出し、症例個々において多様な感染症による脳炎・脳症へと進展している可能性が示唆された。髄液からは検出されないが、咽頭拭い液から Human parainfluenzavirus 4, Human parechovirus 6, Saffold virus 2 を検出し、呼吸器感染症の増悪も関連している可能性が示唆された。血液関連検体 (血清、血漿、全血) から、主に Torque teno virus (亜種含む) を検出する症例が多く、不顕性感染しているウイルスが全身性炎症にともなって再活性化している可能性が示唆された。Enterovirus 等を起因病原体として疑う場合、便検体の検査は有効である。

(黒田誠、関塚剛史、片野晴隆[感染病理部]、高崎智彦[ウイルス第一部]、多屋馨子[感染症疫学センター])

品質管理に関する業務 HPV ワクチンの国家検定

HPV ワクチン (2価ワクチンおよび4価ワクチン) の検定を製剤担当室として担当した。検定試験項目の内、VLP 力価試験を試験担当室として実施した。また HPV ワクチンの製造・試験記録等要約書 (summary lot protocol) の審査を実施した。(石井克幸、竹内隆正、終元 巖、黒田 誠)

HPV ワクチンの承認前検査

承認申請された新規 9 価 HPV ワクチンの承認前検査を製剤担当室として担当した。感染研にて実施する試験項目を選定して、メーカーから試験品の提供を受け、試験方法の妥当性について検討を行った。(石井克幸、終元巖、黒田 誠)

国際協力関係業務

WHO HPV ラボラトリーネットワーク活動

WHO によって結成された HPV ラボラトリーネットワーク (HPV ラボネット) の、西太平洋地域リファレンスラボとしての活動を行った。HPV DNA proficiency panel study に参加し、タイピング結果を WHO に報告した。その結果、信頼性のあるリファレンスラボとして認定を受けた。(中村浩美、石井克幸、終元 巖)

発表業績一覧

I. I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) I. Kukimoto, and M. Muramatsu. Genetic variations of human papillomavirus type 16: implications for cervical carcinogenesis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 68:169-175 (2015)
- 2) I. Kukimoto, S. Mori, S. Aoyama, K. Wakae, M. Muramatsu, and K. Kondo. Hypermutation in the E2 gene of human papillomavirus type 16 in cervical intraepithelial neoplasia. *Journal of Medical Virology*, 87:1754-1760 (2015)
- 3) K. Wakae, S. Aoyama, Z. Wang, K. Kitamura, G. Liu, A. M. Monjurul, M. Koura, M. Imayasu, N. Sakamoto, M. Nakamura, S. Kyo, S. Kondo, H. Fujiwara, T. Yoshizaki, I. Kukimoto, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, T. Nishiyama, and M. Muramatsu. Detection of hypermutated human papillomavirus type 16 genome by Next-Generation Sequencing. *Virology*, 485:460-466 (2015)
- 4) Miyakawa K, Matsunaga S, Kanou K, Matsuzawa A, Morishita R, Kudoh A, Shindo K, Yokoyama M, Sato, H, Kimura H, Tamura T, Yamamoto N, Ichijo H, Takaori-Kondo A, Ryo A. ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction. *Nat. Commun.*, 6:6945, 2015.
- 5) Lim HW, Kang SG, Ryu JK, Schilling B, Fei M, Lee IS, Kehasse A, Shirakawa K, Yokoyama M, Schnölzer M,

- Kasler HG, Kwon HS, Gibson BW, Sato, H, Akassoglou K, Xiao C, Littman DR, Ott M, Verdin E. SIRT1 deacetylates ROR γ t and enhances Th17 cell generation. *J. Exp. Med.*, 212(5):607-617, 2015.
- 6) Lu Z, Yokoyama M, Chen N, Oka T, Jung K, Chang KO, Annamalai T, Wang Q, Saif LJ. Mechanism of cell culture adaptation of an enteric calicivirus, porcine sapovirus Cowden strain. *J. Virol.*, 90(3):1345-1358, 2016.
 - 7) Yokoyama M, Nomaguchi M, Doi N, Kanda T, Adachi A, Sato, H. *In silico* Analysis of HIV-1 Env-gp120 Reveals Structural Bases for Viral Adaptation in Growth-Restrictive Cells. *Front. Microbiol.* 7:110, 2016.
 - 8) Sultana T, Nakayama EE, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Sato, H, Shioda T. Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. *J. Gen. Virol.*, 97(4):963-76, 2016.
 - 9) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. 35(2):107-21, 2015.
 - 10) Kataoka C, Suzuki T, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ami Y, Wakita T, Nishimura Y, Shimizu H. The Role of VP1 Amino Acid Residue 145 of Enterovirus 71 in Viral Fitness and Pathogenesis in a Cynomolgus Monkey Model. *PLoS Pathog.* 16;11(7):e1005033, 2015.
 - 11) Kotani O, Naeem A, Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Nakajima N, Hosomi T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Hasegawa H, Taguchi F, Shimizu H, Nagata N. Neuropathogenicity of Two Saffold Virus Type 3 Isolates in Mouse Models. *PLoS One*. 11(2):e0148184, 2016.
 - 12) Satowa Suzuki, Mamoru Ohnishi, Michiko Kawanishi, Masato Akiba and Makoto Kuroda Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect Dis*. 16(3):284-285, 2016
 - 13) Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka and Makoto Kuroda. VirusTAP: Viral Genome-Targeted Assembly Pipeline. *Front. Microbiol.* 7:32 2016.
 - 14) Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yoshiro Murase, Tomotada Iwamoto, Satoshi Mitarai, Seiya Kato and Makoto Kuroda. TGS-TB: Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* Using Short-Read

- Whole-Genome Sequencing. *PLoS One*. 10(11):e0142951, 2015.
- 15) Akiko Kinumaki, Tsuyoshi Sekizuka, Hiromichi Hamada, Kengo Kato, Akifumi Yamashita and Makoto Kuroda. Characterization of the gut microbiota of Kawasaki disease patients by metagenomic analysis. *Front Microbiol.* 6:824, 2015.
- 16) Bin Chang, Akiyoshi Nariai, Tsuyoshi Sekizuka, Yukihiro Akeda, Makoto Kuroda, Kazunori Oishi and Makoto Ohnishi. Capsule Switching and Antimicrobial Resistance Acquired during Repeated *Streptococcus pneumoniae* Pneumonia Episodes. *J Clin Microbiol.* 53(10):3318-3324, 2015.
- 17) Tohru Daikoku, Yukari Oyama, Misako Yajima, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Yuka Shimada, Kazuhiko Takehara, Naoko Miwa, Tomoko Okuda, Tetsutaro Sata and Kimiyasu Shiraki. Identification of ribonucleotide reductase mutation causing temperature-sensitivity of herpes simplex virus isolates from whitlow by deep sequencing. *Clin Case Rep.* 3(6):461-7, 2015.
- 18) Hirokazu Kimura, Mika Saitoh, Miho Kobayashi, Haruyuki Ishii, Takeshi Saraya, Daisuke Kurai, Hiroyuki Tsukagoshi, Komei Shirabe, Atsuyoshi Nishina, Kunihisa Kozawa, Makoto Kuroda, Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Hisanori Minakami, Akihide Ryo and Makoto Takeda. Molecular evolution of haemagglutinin (H) gene in measles virus. *Sci Rep.* 5:11648, 2015.
- 19) Fumihiko Takeuchi, Tsuyoshi Sekizuka, Yumiko Ogasawara, Hiroshi Yokoyama, Ryoma Kamikawa, Yuji Inagaki, Tomoyoshi Nozaki, Yoshiko Sugita-Konishi, Takahiro Ohnishi and Makoto Kuroda. The Mitochondrial Genomes of a Myxozoan Genus *Kudoa* are Extremely Divergent in Metazoa. *PLoS One*. 10(7):e0132030, 2015
- 20) Fumihiko Takeuchi, Yumiko Ogasawara, Kengo Kato, Tsuyoshi Sekizuka, Tomoyoshi Nozaki, Yoshiko Sugita-Konishi, Takahiro Ohnishi and Makoto Kuroda. Genetic variants of *Kudoa septempunctata* (Myxozoa: Multivalvulida), a flounder parasite causing foodborne disease. *Journal of Fish Diseases.* 667-72, 2016
- 21) Akifumi Yamashita, Tsuyoshi Sekizuka and Makoto Kuroda. GcoGSA-BA: A Global Core Genome SNP Analysis for *Bacillus anthracis*. *Health Security.* 13(1) 64-68, 2015.
- 22) Ken-ichi Lee, Masahiro Kusumoto, Tsuyoshi Sekizuka, Makoto Kuroda, Ikuo Uchida, Taketoshi Iwata, Susumu Okamoto, Kimiko Yabe, Takashi Inaoka and Masato Akiba. Extensive amplification of GI-VII-6, a multidrug resistance genomic island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, increases resistance to extended-spectrum cephalosporins. *Front Microbiol.* 6:78, 2015
- 23) Shinichiro Shibata, Tsuyoshi Sekizuka, Akari Kodaira, Makoto Kuroda, Kei Haga, Yen Hai Doan, Reiko Takai-Todaka, Kazuhiko Katayama, Takaji Wakita, Tomoichiro Oka and Hiroyuki Hirata. Complete Genome Sequence of a Novel GV.2 Sapovirus Strain, NGY-1, Detected from a Suspected Foodborne Gastroenteritis Outbreak. *Genome Announc.* e01553-14, 2015
- 24) Kouji Sakai, Tsuyoshi Sekizuka, Yasushi Ami, Noriko Nakajima, Minori Kitazawa, Yuko Sato, Katsuhiko Nakajima, Masaki Anraku, Toru Kubota, Katsuhiko Komase, Kazuaki Takehara, Hideki Hasegawa, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Makoto Kuroda and Makoto Takeda. A Mutant H3N2 Influenza Virus Uses an Alternative Activation Mechanism in TMPRSS2 Knockout Mice by Loss of an Oligosaccharide in the Hemagglutinin Stalk Region. *J Virol.* 5154-5158, 2015
- 25) Makoto Kuroda, Shoichi Niwa, Tsuyoshi Sekizuka, Hiroyuki Tsukagoshi, Masaru Yokoyama, Akihide Ryo, Hironori Sato, Naoko Kiyota, Masahiro Noda, Kunihisa Kozawa, Komei Shirabe, Takashi Kusaka, Naoki Shimojo, Shunji Hasegawa, Kazuko Sugai, Masatsugu Obuchi, Masato Tashiro, Kazunori Oishi, Haruyuki Ishii and Hirokazu Kimura. Molecular evolution of the VP1, VP2, and VP3 genes in human rhinovirus species C. *Sci Rep.* 5:8185, 2015.
- 26) Nagasawa K, Hirano E, Kobayashi M, Ryo A, Oishi K, Obuchi M, Ishiwada N, Noda M, Kuroda M, Shimojo N, Kimura H. Molecular evolution of the hypervariable region of the attachment glycoprotein gene in human respiratory syncytial virus subgroup B genotypes BA9 and BA10. *Infect Genet Evol.* 2015 Dec;36:217-23. doi: 10.1016/j.meegid.2015.09.020. Epub 2015 Sep 25. PubMed PMID: 26408340.
- 27) Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, Katayama K, Kimura H. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. *Sci Rep.* 2015 Sep 4;5:13806. doi: 10.1038/srep13806. PubMed PMID:

26338545; PubMed Central PMCID: PMC4559769.

2. 和文発表

- 1) 黒田誠 薬剤耐性プラスミドの菌株間伝達や菌種間伝達を考慮したアウトブレイク発生時のプラスミド解析 「化学療法の領域」 7月号 (2015年6月)
- 2) 黒田誠 ウイルス分野における次世代DNAシーケエンサーの活用 「臨床とウイルス」特集号 43/3 2015年7月号 (2015年7月)

II. 学会発表

1. 国際学会

- 1) I. Kukimoto, K. Kondo, M. Muramatsu, and S. Mori. Hypermutation in the *E2* gene of HPV16 in cervical intraepithelial neoplasia. DNA Tumour Virus Meeting (2015年7月、トリエステ)
- 2) K. Wakae, M. Nakamura, S. Kondo, H. Fujiwara, T. Yoshizaki, I. Kukimoto, T. Nishiyama, and M. Muramatsu. Next generation sequencing detects APOBEC3 mediated hypermutation in human papillomavirus type 16 genome in vivo. DNA Tumour Virus Meeting (2015年7月、トリエステ)
- 3) A. Taguchi, K. Nagasaka, K. Kawana, H. Nakamura, K. Hashimoto, S. Kato, R. Kusumoto-Matsuo, K. Oda, C. Plessy, I. Kukimoto, P. Carninci, L. Banks, Y. Osuga, and T. Fujii. Characterization of novel antisense RNAs of HPV16 genome and the possibility of clinical application as a diagnostic biomarker. DNA Tumour Virus Meeting (2015年7月、トリエステ)
- 4) S. Mori, T. Takeuchi, Y. Ishii, and I. Kukimoto. Mechanisms of *APOBEC3B* promoter activation by HPV16 E6. 30th International Papillomavirus Conference (2015年9月、リスボン)
- 5) T. Fujii, A. Ohwaki, M. Saito, T. Iwata, I. Kukimoto, H. Sato, O. Takayuki, and T. Yutaka. How do we treat and care the patient with multiple primaries followed with a recurrent anogenital cancer? : a case report. 30th International Papillomavirus Conference (2015年9月、リスボン)
- 6) K. Nagasaka, A. Taguchi, K. Kawana, K. Hashimoto, C. Plessy, H. Nakamura, M. Thomas, K. Oda, I. Kukimoto, P. Carninci, L. Banks, Y. Osuga, and T. Fujii. A new approach for screening cervical cancer by characterization of transcripts using CAGE technology. ASCO Annual Meeting (2015年6月、シカゴ)
- 7) Y. Masuda, I. Kukimoto, C. Masutani. Mechanism of Lysine 48-linked Multiple Ubiquitin Chain Synthesis by an HECT Ubiquitin Ligase. EMBO Conference on Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers: From molecular mechanisms to human diseases (2015年9月、サブタット・クロアチア)
- 8) Seki S, Nomura T, Nishizawa M, Yokoyama M, Sato, H, Miura T, Koyanagi Y, Matano T. Viral genome mutations resulting in escape from protective MHC-I-associated CD8⁺ T cells can be maintained after multiple SIV transmissions among MHC-I-mismatched macaques. 33rd Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. October 13 – 16, 2015, Monterey, CA, USA.
- 9) Harada S, Yokoyama M, Matsushita S, Sato, H, Matano T, Yoshimura K. Molecular Dynamics of the CD4-Mimetic Resistant HIV-1 Gp120 by MD Simulation. The 2016 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Boston, Massachusetts, USA, 2016.
- 10) Sultana T, Nakayama E, Tobita S, Yokoyama M, Seki Y, Saito A, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Sato, H, Shioda T. Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI). February 22 -25, 2016, Boston, USA.
- 11) Akifumi Yamashita, Tetsuya Sakamoto, Tsuyoshi Sekizuka, and Makoto Kuroda. Geographical view of dengue genotype distribution. DENGUE SURVEILLANCE: INFORMATION-SHARING AMONG ASIAN COUNTRIES FOR A BETTER PREPARED REGION (2015年9月 国立感染症研究所)
- 12) Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Yoshiro Murase, Tomotada Iwamoto, Satoshi Mitarai, Seiya Kato, Makoto Kuroda. TGS-TB: Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* using short-read whole-genome sequencing. 1st ASM Conference on Rapid NGS Bioinformatic Pipelines for Enhanced Molecular Epidemiologic Investigation of Pathogens (2015年9月 アメリカ・ワシントン DC)
- 13) Tsuyoshi Sekizuka, Akifumi Yamashita, Makoto Kuroda. TGS-TB: Total Genotyping Solution for *Mycobacterium tuberculosis* using short-read whole-genome sequencing. 8th Meeting on Global Microbial Identifier (GMI) (2015年5月 中国・北京)

2. 国内学会

- 1) I. Kukimoto, S. Mori, and K. Kondo. Hypermutation in the *E2* gene of HPV16 in cervical intraepithelial neoplasia. 第74回日本癌学会学術総会 (2015年10月、名古屋)
- 2) A. Taguchi, K. Nagasaka, K. Kawana, H. Nakamura, I. Kukimoto, K. Oda, and T. Fujii. The significance of the existence of novel HPV16 derived antisense RNAs and the TSS-switch of HPV16 transcriptomes. 第74回日本癌学会学術総会 (2015年10月、名古屋)
- 3) 石井克幸, 森 清一郎, 竹内隆正, 柗元 巖, The L2 capsid protein of HPV16 promotes viral uncoating by inhibiting virus entry into the Golgi body through the L2-TRAPPC8 interaction. 第68回日本ウイルス学会学術集会(2015年11月、福岡)
- 4) 柗元 巖, 森 清一郎, ヒトパピローマウイルス癌蛋白質 E6 による APOBEC3B プロモーター活性化の分子機構、第14回生命科学研究会(2015年6月、三崎)
- 5) 増田雄司, 柗元 巖, 益谷央豪, HECT タイプユビキチンリガーゼによる K48 ユビキチン鎖合成の分子機構 第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会 (2015年12月、神戸)
- 6) 石井克幸, 森 清一郎, 竹内隆正, 柗元 巖, ヒトパピローマウイルス生活環におけるキャプシドタンパク質L2と細胞内タンパク質TRAPPC8との相互作用の役割、第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会(2015年12月、神戸)
- 7) 大脇晶子、石井梨沙、河合智之、市川亮子、鳥居裕、西尾永司、西澤春紀、山本直樹、柗元 巖、齋藤深雪、岩田 卓、藤井多久磨、肛門管癌治療後に外陰・膣・子宮頸部に腫瘍が発生し、治療に苦慮した肛門性器癌の1例、第53回日本癌治療学会学術集会 (2015年10月、京都)
- 8) 佐藤裕徳. コンピュータ科学が HIV を追いつめる—HIV Gag 研究班の取り組み—シンポジウム 5 (基礎) ウイルス標的：持続感染・潜伏感染. 第29回日本エイズ学会学術集会・総会, 2015年12月1日(火)、東京(東京ドームホテル).
- 9) 横山勝, 朴 英斌, 片山和彦, 佐藤裕徳. 分子動力学計算によるノロウイルスポリメラーゼの動的性質の解析. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 2015年11月22-24日(日-火)、福岡.
- 10) 横山勝, 佐藤裕徳. 抗体中和抵抗性gp120 構造を維持するGlycan shield の分子メカニズム. 第29回日本エイズ学会学術集会・総会, 2015年12月1日(火)、東京(東京ドームホテル).
- 11) 横山勝, 佐藤裕徳. HIV-1 gp120 における Glycan shieldの分子メカニズム. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会(BMB2015), 神戸, 2015.
- 12) 小谷治, 横山勝, 鈴木忠樹, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 清水博之, 佐藤裕徳, 永田典代. A molecular mechanism of adaptive evolution of Saffold virus type 3 in cerebellum of mouse (サフォードウイルス3型のマウス小脳馴化の分子機構). 第63回日本ウイルス学会学術集会. 2015年11月22-24日(日-火)、福岡.
- 13) 本村和嗣, 横山勝, 中村浩美, 岡智一郎, 片山和彦, 野田衛, 田中智之, 武田直和, 佐藤裕徳, Norovirus Surveillance Group of Japan (ノロウイルス GII.4_2006b と GII.4_Sydney2012 亜株におけるカプシド蛋白質の多様性と進化の比較). 第89回日本感染症学会総会・学術講演会. 2015年4月16-17日(木~金)、京都(国立京都国際会館).
- 14) Seki S, Nomura T, Nishizawa M, Yokoyama M, Sato H, Miura T, Koyanagi Y, Matano T. Accumulation of viral genome mutations in multiple SIV transmissions. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 2015年11月22-24日(日-火)、福岡.
- 15) 朴英斌, 戸高玲子, 芳賀慧, 下池貴志, 福士秀悦, 染谷雄一, 横山勝, 佐藤裕徳, 河合文啓, 朴三用, 片山和彦. Functional Analysis of Human Norovirus RNA-dependent RNA Polymerase. 第63回日本ウイルス学会学術集会. 2015年11月22-24日(日-火)、福岡.
- 16) 山田祥平, 小谷治, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 清水博之 永田典代. The pathogenesis of a Saffold virus isolate from upper respiratory inflammation in a mouse model (マウスモデルにおけるSaffold virus 上気道炎株の病原性). 第63回日本ウイルス学会学術集会 (2015年11月、福岡)
- 17) 永田典代, 潮田和佳, 中村朋史, 飯塚節子, 小谷治, 岩田奈織子, 清水博之, 長谷川秀樹. Utility of a neonatal mouse model for studying coxsackievirus B2. 新生仔マウスを用いたコクサッキーウイルスB2の病原性評価の有用性. 第63回日本ウイルス学会学術集会 (2015年11月、福岡)

- 18) 宮武秀行、三城明、村上知行、村上裕信、松田剛、萩原恭二、横山勝、佐藤裕徳、宮本洋一、堂前直、間陽子。X 線結晶構造解析による HIV_1 Vpr の importin_α への結合機構の解析。第29回日本エイズ学会学術集会・総会，2015年12月1日（火）、東京（東京ドームホテル）。
- 19) 引地優太、横山勝、竹村太地郎、藤野真之、熊倉成、山本直樹、佐藤裕徳、俣野哲朗、村上努。CXCR4 阻害剤耐性変異が中和抗体感受性に及ぼす影響の解析。第29回日本エイズ学会学術集会・総会，2015年12月1日（火）、東京（東京ドームホテル）。
- 20) 原田恵嘉、横山勝、佐藤裕徳、松下修三、俣野哲朗、玉村啓和、吉村和久。CD4 類似低分子化合物誘導体（CD4MCs）の耐性機序解析。第29回日本エイズ学会学術集会・総会，2015年12月1日（火）、東京（東京ドームホテル）。
- 21) 岡智一郎、高木弘隆、横山勝、小島宏建、岡部隆義、長野哲雄、佐藤裕徳。ネコカリシウイルスプロテアーゼの基質特徴を有する非ペプチド性低分子化合物の抗ウイルス活性。日本薬学会第136年会，横浜，2016。
- 22) 杉由高、長谷川紀子、山下明史、関塚剛史、黒田誠。*Streptococcus intermedius* のマウス皮下膿瘍における転写調節機構。第88回日本細菌学会（大阪市，2016年3月）
- 23) 李謙一、石原朋子、伊豫田淳、小椋義俊、林哲也、関塚剛史、黒田誠、大西真、Working Group EHEC。全ゲノム配列を用いた腸管出血性大腸菌 0121 の散在的集団感染事例の解析。第88回日本細菌学会（大阪市，2016年3月）
- 24) 仙波敬子、山下まゆみ、園部祥代、横山栄二、関塚剛史、調恒明、黒田誠、四宮博人。患者及び食材から分離された *Salmonella* Infantis 株の次世代シーケンサーによるゲノム系統解析。第88回日本細菌学会（大阪市，2016年3月）
- 25) 加藤健吾、関塚剛史、稲嶺由羽、山下明史、黒田誠。急性膀胱炎の起因菌 *Staphylococcus saprophyticus* 分離株におけるゲノムアイランド SCC の構造比較解析。第88回日本細菌学会（大阪市，2016年3月）
- 26) 秋庭正人、関塚剛史、山下明史、黒田誠、李謙一、岩田剛敏、楠本正博、Keerthi Guruge。インドの環境由来 β-ラクタム系抗生物質耐性大腸菌における耐性遺伝子の分布。第88回日本細菌学会（大阪市，2016年3月）
- 27) 関塚剛史、山下明史、村瀬良朗、岩本朋忠、御手洗聡、加藤誠也、黒田誠。次世代シーケンサーによる結核菌ゲノム分子疫学解析ツール。第88回日本細菌学会（大阪市，2016年3月）
- 28) 今村大輔、森田昌知、関塚剛史、水野環、竹村太地郎、山城哲、三好伸一、黒田誠、大西真、篠田純男。コルカタにおける2007-2014年コレラ流行株の全ゲノム解析によって明らかになった VSP-II の変化。第88回日本細菌学会（大阪市，2016年3月）

III. 学会等（財団等を含む）の学術賞受賞者
なし

IV. 研究助成金等（財団等の競争的資金）獲得者
なし